------مجلة علوم الرافدين، المجلد 22، العدد 3، ص 22-34، 2011------

التحول الوراثي لبكتريا *Sinorhizobium meliloti* بواسطة بلازميدات بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* باستخدام تقنية الاقتران

جاسم محمد ياسين احمد
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 22/ 3 / 2011 ؛ تاريخ القبول 25 / 4 / 2011)

الملخص

تناولت الدراسة الحالية عملية عزل بكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنبات ألجت، وأجريت عملية التحول الوراثي لها باستخدام تقنية الاقتران مع بكتريا *Agrobacetrium tumefaciens* المحورة وراثيا. أظهرت النتائج مدى كفاءة هذه العملية إذ بينت النتائج الأولية لفحوصات المضادات الحيوية الحصول على عليمتين وراثيتين وهي المقاومة للمضادين Chloramphenicol و Rifampicin في السلالة البكتيرية المقترنة إلى نجاح انتقال البلازميد **Ti** (Tumor- inducing Plasmid) من بكتريا *A. tumefaciens*، فضلا على أن السلالة المقترنة أظهرت قابلية على إنتاج صبغة الميلانين. ولأجل التأكد من حصول عملية الاقتران تم تلقيح نباتات ألجت بالسلالة المقترنة وقد أوضحت النتائج نجاح هذه العملية من خلال تكون الأورام التاجية التي يحدثها البلازميد **Ti** في سيقان النباتات وتكون العقد الجذرية في نفس النبات. تشير هذه النتائج إلى إمكانية إجراء تقنية الاقتران بين الأنواع المختلفة لعائلة *Rhizobiaeceae* للحصول على عزلات جديدة تحمل صفات مفيدة يمكن نقلها إلى النباتات البقولية والحصول على نباتات محولة وراثيا ذات صفات جديدة.

Genetic Transformation of *Sinorhizobium meliloti* by *Agrobacterium tumefaciens* Plasmids Using Conjugation Technique

Jasim M.Y. Ahmed
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The present study included isolation of *Sinorhizobium meliloti* bacteria from the root nodules of Alfalfa plants, Transformation process was conducted by conjugation with transformed bacteria *Agrobacterium tumefaciens.* The results showed the efficiency of the process, where the antibiotic tests acquire two genetic labels, resistance to chloramphenicol and rifampicin on the conjugated strain, proved that Ti plasmid (Tumor-inducing Plasmid) transferred from the *A. tumefaciens* as well as that the conjugated strain produces melanin pigment. For more assurance, Alfalfa plants were inoculated with the conjugated strain, and the results showed the success of conjugation via crown gall formation on stem which formed by Ti plasmid in addition to root nodules in same plant. These results indicate the capability of performing conjugation technique between different species of *Rhizobiaeceae* to acquire new isolates carrying beneficial characteristics that are able to be transfer to plants and produce a new desired genetic transformed plants.

المقدمة

تنتمي كل من بكتريا *Agrobactrium tumefaciens* وهي من أنواع البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام التي تعيش في التربة و تحتوي على بلازميد Ti (Tumor-inducing Plasmid) المسؤول عن تكوين الأورام التاجية Crown gall tumor في النباتات خلال إصابتها لها (Hooykaas and Schilperoort, 1992)، وبكتريا *Sinorhizobium meliloti* التي تعيش كذلك في التربة وهي سالبة لصبغة كرام أيضا إلى عائلة Rhizobiaeceae والتي لها القابلية على إقامة علاقة تعايشية مع النباتات البقولية (Garcia-de los *et al*., 1996) وخاصة مع نباتات الجت (Streit *et al*., 2004)، تؤدي إلى تكوين عقد جذرية تفيد النباتات عن طريق اختزالها النتروجين الجوي إلى الأمونيا التي تدخل في بناء البروتينات الضرورية للنمو و بالإضافة إلى تزويده ببعض المواد المفيدة الأخرى (Schultze and Kondorsi, 1998).

تعد عملية الاقتران البكتيري إحدى عمليات التحول الوراثي التي تسمح بانتقال قطع كبيرة من المادة الوراثية DNA من خلال التماس المباشر بين خليتين بكتيريتين أحداهما تسمى بالواهبة يرمز لها بـالرمز (F^+) والأخرى بالمستلمة يرمز لها بالرمز (F^-)، إذ تمتلك البلازميدات الكبيرة غالبا قابلية الانتقال بواسطة الاقتران وذلك عن طريق عوامل وراثية ناقلة واقعة على الـ DNA البلازميدي هي مورثات الانتقال tra genes إذ تعمل هذه الجينات في الخلية الواهبة على تكوين شعيرات أو تراكيب تسمى Pili تـربط بـين النوعين البكتيـريين المقتـرنين مكونـة مـا يـسمى بجـسر الاقتـران أو أنبـوب الإخـصاب Pilus (Ferguson *et al.*, 2002)، ينتقل عبره أحد شريطي الـ DNA البلازميدي بعـد تقطيعـه مـن قبـل الأنزيمات القاطعة التي تشفر من قبل المورث المتحرك mob gene وتحولها إلى جزيئـه DNA خطيـة تتحرك إلى الخلية المستلمة (Strohmaier *et al.*, 1998).

من المعروف أن للبلازميدات الدور الكبير في إظهار صفة المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية (Vicente *et al.*,1989)، إذ تمتلك كلا المجموعتين من الخلايا البكتيرية السالبة والموجبة لـصبغة كـرام بلازميدات المقاومة R plasmids التي تشفر صفة المقاومة للعديد من المضادات الحيوية، وبانتقال مورثات المقاومة أو الحساسية هذه عن طريق البلازميد من خلية بكتيرية إلى أخـرى تكتـسب الخليـة المـستلمة الوحدات الوراثية التي تشفر المقاومة للعديد من المضادات الحيوية وتكون هـي المـسؤولة عـن تـراكم محددات r وتضاعفها في المادة الوراثية للخلايا البكتيرية المتحولة (Lujan *et al.*, 2007).

تتميز أفراد جنس بكتريـا *Agrobactrium* بقـدرتها علـى نقـل جـزء مـن مادتهـا الوراثيـة (جزء أو أحد شريطي DNA البلازميدي) بالتماس الخلوي المباشـر عـن طريـق تراكيـب الـ Pili وتكوين جسور الاقتران إلى الخلية البكتيرية المستلمة، إضافة إلى صفتها الطبيعية وقدرتها على نقل مادتها الوراثية إلى الخلايا حقيقية النواة من خلال إصابتها للخلايا النباتية وخاصة ذوات الفلقتـين عـن طريـق الجروح (Fullner *et al.*, 1996)، كما يمكن نقلها أيضا إلى خلايا الخميرة والفطريات الخيطية وأخيرا إلى خلايا الإنـسان (Kunik *et al.*, 2001 ؛ De Groot, 1998 ؛ Hooykaas and Bundock, 1996) على التوالي، فضلا عن أن هناك دراسات كثيرة أكدت على حدوث عملية الاقتران بين أنواع مختلفة مـن البكتريا (Hill, 1999 ؛ Nerey *et al.*, 2002). وبما أن الصفة التي يمتلكها كل نوع بكتيري من السلالات المستخدمة هي متخصصة لذلك أصبح بالإمكان كسر حاجز التخصص بهذه التقنية، ولكون هـذه الأنـواع البكتيرية تعيش في بيئة واحدة هي التربة فمن الممكن حدوث عملية الاقتران بينها في الطبيعة، لذا جـاءت هذه الدراسة بهدف إمكانية تطبيق تقنية الاقتران في المختبر ومعرفة أثرها على النباتـات جـراء انتقـال

الصفات من بكتريا *A. tumefaciens* بوصفها خلايا واهبه إلى بكتريا *S. meliloti* بوصفها خلايا مستلمه كونها بتماس مباشر مع نباتات الجت من خلال علاقتها التعايشية معها.

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية

استخدمت كل من بكتريا *Agrobactrium tumefaciens* C58C1 rifR(pM90) وهي عزلة محورة وراثياً من مؤسسة (UGent-VIB Research Belgium) في جامعة جينت البلجيكية، وبكتريا *Sinorhizobium meliloti* وهي عزلة محلية عزلت من العقد الجذرية لنباتات الجت.

الأوساط المستخدمة

استخدم وسط Yeast Extract Mannitol (YEM) لتنمية بكتريا *S. meliloti* (Vincent ,1970) والوسط Yeast Extract Beef (YEB) لتنمية البكتريا *A. tumefaciens* (Lichtenstein and Draper,1986) والوسطان الأكار المغذي Nutrient agar والسائل Nutrient broth.

اختبار تكوين العقد التاجية على بادرات الجت

أجريت عملية تلقيح لبادرات نبات الجت بعمر تراوح ما بين أسبوعين الى ثلاثة أسابيع بلقاح بكتريا *A. tumefaciens* بعمر 48 ساعة وذلك بحقن البكتريا عن طريق وخز سيقان بادرات الجت، ثم وضعت البادرات في الحاضنة وقد تمت متابعتها للتأكد من تكون العقد التاجية التي يسببها البلازميد Ti في هذه البكتريا.

عزل بكتريا *Sinorhizobium meliloti*

جمعت نباتات ألجت من الحقل وتم عزل بكتريا *Rhizobium* حسب طريقة (Atlas *et al*., 1995) وذلك بأخذ المجموع الجذري وغسله بالماء الجاري بصورة جيدة للتخلص من الرمل العالق به. ُقطعت العقد الجذرية مع جزء من الجذر ثم ُعقمت بالكحول 70% لمدة 10 دقائق ثم غسلت بالماء المعقم، ُغمرت بالقاصر (مادة هايبوكلورات الصوديوم) بتركيز 6% لمدة 5 دقائق ثم غسلت بالماء المعقم لإزالة تأثير القاصر، ثم وضعت على ورقة ترشيح معقمة للتخلص من الماء العالق.

وضعت العقد الجذرية على سطح وسط الأكار المغذي N. agar في أطباق بتري معقمة وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 28 ºم. هرست العقد غير الملوثة مع قطرات من الماء المعقم ثم نقل العالق بحملة لوب وزرع بطريقة التخطيط في أطباق حاوية على الوسط YEM.

التلقيح المختبري لنباتات الجت ببكتريا *Sinorhizobium meliloti* المعزولة

لغرض التأكد من البكتريا المعزولة عقمت بذور نبات ألجت باستخدام مادة القاصر (هايبوكلورات الصوديوم) بتركيز 6%، خفف بالماء المقطر بنسبة 3/1 ثم أزيل تأثيره بالماء المقطر المعقم، من ثم عقمت بالكحول الاثيلي 70% ثم أزيل تأثير الكحول بالماء المقطر المعقم وذلك بتكرار غسله مرات عديدة بعد كل معامله، جففت البذور باستخدام أوراق ترشيح معقمة. زرعت البذور المعقمة في أطباق حاوية على وسط Nitrogen Fixation (NF) الصلب (Fahraeus , 1957)، ثم حضنت الأطباق بشكل مائل في الحاضنة بدرجة 28 ºم لمدة أسبوعين إلى ثلاثة أسابيع، لقحت بادرات الجت بالبكتريا المعزولة بغمر جذور النبات باللقاح البكتيري المحضر لمدة 15-20 دقيقة، جففت الجذور باستخدام أوراق ترشيح معقمة ثم وضعت البادرات في أطباق حاوية على وسط NF الصلب وحضنت في ظروف ملائمة، بعد ذلك تم التحري عن تكون العقد الجذرية، كما وتم إعادة التلقيح بالبكتريا الناتجة من الاقتران بإصابة البادرات في منطقة الساق وذلك لدراسة إمكانية تكوين كل من الأورام التاجية و العقد الجذرية المثبتة للنتروجين الجوي عليها.

اختبار المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية

تم اختبار العديد من المضادات الحيوية وذلك من خلال إضافتها إلى الوسط الغذائي لإيجاد المضادات الحيوية المناسبة لغرض تحديد حساسية ومقاومة العزلات المستخدمة في الدراسة للحصول على اختلاف في عليمتين وراثيتين على الأقل واستخدامها دلائل أو علائم وراثية في اختبار الاقتران حسب (Atlas *et al*.,1995)، يبين الجدول (1) المضادات الحيوية و تراكيزها المستخدمة في الدراسة :

الجدول1 : التراكيز الخزينة و النهائية للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة.

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز الخزين ملغم/سم^3	التركيز النهائي مايكروغرام/سم^3	المذيب المستخدم
Ampicillin	AMP	50	50	ايثانول 70%
Rifampicin	RIF	100	100	ايثانول 70%
Gentamicin	GM	80	40	ماء مقطر
Chloramphenicol	CHL	35	35	ايثانول مطلق
Streptomycin	SM	20	20	ايثانول 70%
Cefotaxime	CTX	30	30	ماء مقطر

الاقتران البكتيري

استخدمت البكتريا *A. tumefaciens* بوصفها خلايا واهبة (Tzfira and Citovsky , 2006) والبكتريا *S. meliloti* بوصفها خلايا مستلمة (Ferenczi *et al*., 2004) لدراسة صفة الانتقال لجزيئة DNA البلازميدي من خلال الاقتران البكتيري بين جنسين مختلفين، وتمت الاستفادة من صفة حساسية السلالات المستخدمة للمضادين الحيويين Chloramphenicol و Rifampicin واحدة بعكس الأخرى بوصفها عليمتين وراثيتين على الأقل.

أُجريت عملية الاقتران البكتيري بين بكتريا *A. tumefaciens* و بكتريا *S. meliloti* بطريقة المزج Co cultivation حسب (Olsen *et al*.,1992)، إذ حضنت مزرعة بكتيرية من *A. tumefacciens* في وسطYEB السائل الحاوي على المضادين الحيويين Rifampicin و Gentamicin عند درجة حرارة 28 °م لمدة تتراوح بين 18-24 ساعة، كذلك حضنت مزرعة بكتيرية من *S. meliloti* في وسط YEM السائل الحاوي على المضاد الحيوي Chloramphenicol في الظروف والمدة نفسها.

بعد انتهاء مدة التحضين أخذ 0.7 سم^3 من بكتريا *A. tumefaciens* بوصفها الخلايا الواهبة ودمجت مع 0.3 سم^3 من بكتريا *S. meliloti* باعتبارها الخلايا المستلمة في أنبوبه معقمه، ثم أضيف إلى المزيج 1 سم^3 من وسط المرق المغذي N. broth لتنشيط عملية الاقتران، حضن هذا المزيج لمدة ساعتين في الحاضنة عند درجة 28 °م و بعد انتهاء فترة التحضين أخذ 0.1 سم^3 من المزيج وزرع في أطباق حاوية على الأكار المغذي N. agar حاوية على المضادين الحيويين 100 مايكروغرام/سم^3 Rifampicin

و35 مايكروغرام/سم[3] Chloramphenicol بطريقة النشر، ثم حضنت هذه الأطباق في الحاضـنة عنـد درجة 28 °م لمدة تراوحت بين 48-72 ساعة.

النتائج و المناقشة

اختبار حساسية ومقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

بعد القيام باختبار حساسية ومقاومة البكتريا للمضادات الحيوية تـم اعتمـاد المـضادين الحيـويين Chloramphenicol و Rifampicin بوصفها عليمتين وراثيتين مختلفتين لغرض إجراء عملية الاقتـران البكتيري بين السلالتين *A. tumefactions* و *S. meliloti* . وكانت نتائج الاختبار كما في الجدول (2).

الجدول 2 : مقاومة و حساسية السلالات البكتيرية للمضادات الحيوية .

المضادات / العزلات	تركيز المضادات الحيوية قيد الدراسة ب µg/ml					
	AMP (50)	RIF (100)	GM (40)	CHL (35)	SM (20)	CTX (30)
A . tumefaciens	R	R	R	S	R	R
S. meliloti	R	S	R	R	R	R

حيث يمثل R : صفة المقاومة للمضاد الحيوي و S : صفة الحساسية للمضاد الحيوي.

من خلال النتائج أعلاه ظهران السلالات المستخدمة في الدراسة أبدت مقاومة لغالبيـة المـضادات الحيوية المختبرة وهذا قد يرجع على وجه التحديد إلى تعرضها للمضادات الموجودة في التربة، وكونها من الأنواع البكتيرية (خاصة جنس *Rhizobium*) المكونة لمايكروفلورا الرايزوسفير ممكن أن يفـسر هـذه المقاومة (الحسو و الطائي، 2008). وربما تكون قد كيفت نفسها مع الكثير من المواد الموجـودة فـي التربة المنتجة من الأحياء المجهرية الأخرى المتواجدة في التربة كالفطريات أو ما شابه والتي لها القابليـة على إنتاج المضادات الحيوية، لذلك فان هذه الأنواع البكتيرية ولغرض بقائها واستمرارها طورت لنفـسها آليات ذاتية لمقاومة هذه المضادات (Cho *et al.* ,2009).

ألاقتران البكتيري

لأجل التعرف على قدرة جزيئات الـ DNA البلازميدي في بكتريا *Agrobacterium* على الانتقال الذاتي أجريت عملية الاقتران بين هذه البكتريا و عزلة *S. meliloti* واللتين تختلفان على الأقل بعليمتـين وراثيتين، ويبين الجدول (3) نتيجة الاقتران التي تم الحصول عليها.

الجدول3 : نتيجة عملية الاقتران البكتيري بين سـلالة C58C1 rifR (pM90) *A. tumefactions* وعزلـة بكتريا *S. meliloit* .

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية		صفة المقاومة للمضادات الحيوية من قبل المستعمرات البكتيرية المقترنة	تردد الاقتران
A. tumefaciens	*S. meliloti*		
AMP^R , RIF^R , GM^R , CHL^S , SM^R , CTX^R	AMP^R , RIF^S, GM^R , CHL^R , SM^R , CTX^R	RIF^R , CHL^R	10^{-7}×1.9

يوضح الجدول(3) أن عملية الاقتـران بـين سـلالة C58C1 rifR(pM90) *A .tumefacciens* الواهبة أدت إلى انتقال صفة المقاومة للمضاد الحيـوي Rifampicin إلـى عزلـة بكتريـا *S. meliloti* المستلمة. وقد وجد أن المستعمرات المقترنة استطاعت أن تنمو علـى الوسـط N. agar الحـاوي علـى المضادين الحيوييـن Rifampicin و Chloramphenicol فضلا على أنها ظهرت بشكل اقل هلاميـة مما كانت عليه على وسط N.agar. وبما أن صفة المقاومة للمضاد الحيوي Rifampicin هي صـفة تقـع على بلازميد بكتريا *Agrobacterium* فهذا يشير إلى انتقالها إلى البكتريـا المـستلمة كمـا أشـار اليهـا (Hellens *et al*., 2000).

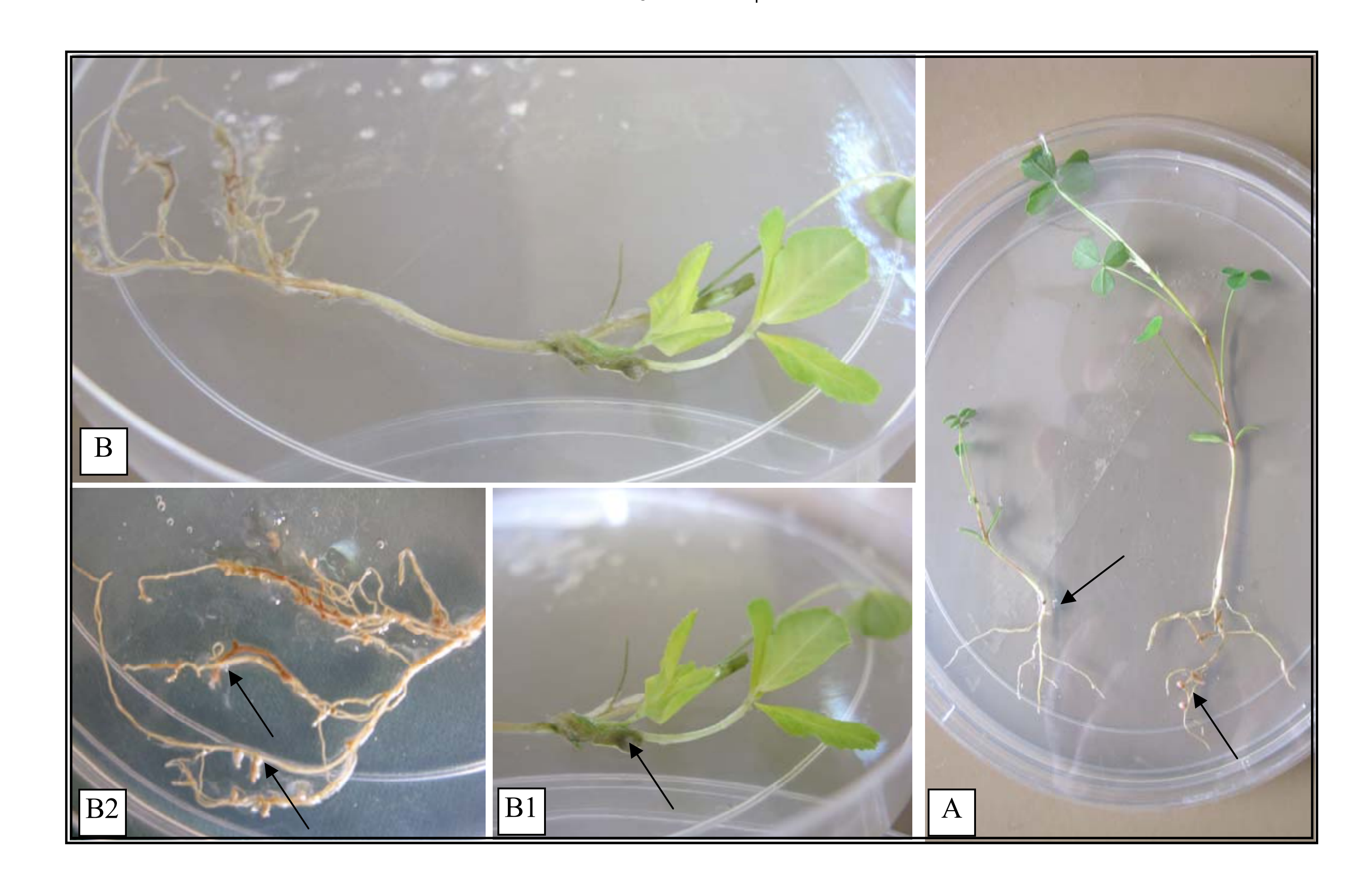
وقد لوحظ بعد إجراء عملية الاقتران أن الوسط الذي نمت عليـه المـستعمرات المقترنـة تلـون باللون الأصفر دلالة على إفرازها نوع من الصبغات المعروفة بهـا بكتريـا *Rhizobium* وهـي صـبغة الميلانين (Cubo *et al.* ,1988)، وبما ان هذه السلالة من بكتريا *S. meliloti* غير منتجة لهذه الـصبغة مقارنة مع السلالات الأخرى من نفس البكتريا (Castro *et al.* , 2000)، فيبدو أن صفة إنتـاج الـصبغة كانت كامنة وعملية الاقتران أدت إلى تحفيز إنتاج صبغة الميلانين من خلال تحفيـز DNA البلازميـدي

الغريب للجين المسؤل عن إظهار صفة إنتاج الصبغة وبالتالي أصبح بإمكان هذه السلالة البكتيرية إنتـاج صبغة الميلانين(Tejerizo *et al*., 2010)، بالإضافة إلى إمكانية نقل ألجين المسؤول عن إنتـاج صـبغة الميلانين إلى السلالات التـي لا تـستطيع إنتاجهـا بـين الأنـواع المختلفـة مـن بكتريـا *Rhizobium* (Mercado-Blanco *et al*., 1993).

تلقيح العائل النباتي بالبكتريا الناتجة من الاقتران

أثبتت الاختبارات الحيوية من خلال تلقيح بادرات نبات ألجت التي بعمر (أسبوعين إلى ثلاثة أسابيع) بالسلالة المقترنة عن طريق غمر جذور البادرات بلقاح البكتريا وأيضا عن طريق إحداث جروح وحقنهـا فيه ، وبعد تحضين البادرات في ظروف مناسبة و مراقبة مستمرة ظهور استجابة لتكوين العقـد الجذريـة خلال 7-12 يوم من فترة التحضين بينما تأخر ظهور الأورام إلى ما بعد الأسبوع الثالث من التحضين كما يظهر في الصورة رقم (1)، وهذا دليل واضح على حدوث عملية الاقتران، كما أكد الكثير مـن البـاحثين نجاح عمليات نقل مبرمجة أو غير مبرمجة لجينات معينـة مـابين بكتريـا *Agrobacterium* وبكتريـا *Rhizobium* عن طريق عملية الاقتران (Beijersbergen ,1993 ؛ Park, 1996).

نستنتج مما تقدم إمكانية إجراء تقنية الاقتران ما بين هذين النوعين من البكتريا للحصول على نوع بكتيري يحمل صفات مميزة من خلال الجمع مابين الصفات التي يحملها النوعـان البكتيريـان ومـن ثـم الاستفادة منها في نقل هذه الصفات إلى النبات عن طريق الإصابة ومن خلال العلاقة التعايشية بين البكتريا والنبات يتم الحصول على نباتات محورة وراثيا تحمل صفات جديدة ومفيدة لم تكن تحملها من قبل، لـذلك نوصي باستخدام الأنواع البكتيرية الأخرى لعائلة *Rhizobiaeceae* وما موجود فيها من أنواع من جنـسي *Agrobacterium* و *Rhizobium* في الحصول على أنواع بكتيرية جديدة باسـتخدام تقنيـة الاقتـران.



صورة 1 : نباتات الجت المزروعة في اطباق حاوية على وسط NF الصلب.

A- بادرات جت ملقحة ببكتريا *S. meliloti* (لاحظ تكون العقد الجذرية كما هو مؤشر).

B- بادرات جت ملقحة بسلالة بكتريا *S. meliloti* المقترنة يبين فيها ظهور العقـد الجذريـة والأورام التاجية.

B1 : تمثل ظهور الاورام التاجية (الجزء المؤشر) في سيقان نبات الجت المتسببة من بلازميد ال Ti المنقول من بكتريا *A. tumefacciens* .

B2 : تمثل ظهور العقد الجذرية (الجزء المؤشر) في جذور نبات الجت.

المصـــادر العربية

الحسو ، محمود زكـي و الطـائي، محمـد إبـراهيم (2008). تقـدير حـساسية بكتريـا *Rhizobium leguminosarum bv.vicie* لمجموعة مضادات البيتا لاكتام. *مجلـة التربيـة والعلـم* . **21** (3)، 66-75.

المصادر الأجنبية

Atlas, R.M.; Parks, L.C.; Brown, A. E. (1995). "Laboratory Manuel of Experimental Microbiology". Mosby Dedicated to publishing Excellence . USA..

Beijerbergen, A. (1993). "Trans-kingdom promiscuity" Similarities between T-DNA transfer by *Agrobacterium tumefaciens* and bacterial conjugation . Ph. D. Thesis, Leiden University, The Netherland.

Bundock, P.; Hooykaas, P.J.J. (1996). Integration of *Agrobacterium tumefaciense* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination . *Proc. Nat Acad. Sci.,* **93,** 15272-15275 .

Castro, S.; Carrera, I.; Martínez-Drets, G. (2000). Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *J. Microbiol. Methods* , **41** , 173-177.

Cho, H.; Pinto, U. M.; Winans, S. C. (2009). Transsexuality in the Rhizosphere: quorum sensing reversibly converts *Agrobacterium tumefaciens* from phenotypically female to male. *J. Bacteriol.*, **191,** 3375-3383.

Cubo, M.T.; Buendia-Claveria, A.M.; Bringer , J.E.; Ruiz-Sainz, J.E. (1988). Melanin production by *Rhizobium* strains . *Appl. Enviroment. Microbiol.,* **54,** 1812-1817.

De Groot, M.J. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* –mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol*. **16,** 839-842.

Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique . *J. Gen. Microbiol.*, **16,** 374-381.

Ferenczi, S.; Ganyu, A.; Blaha, B.; Semsey, S.; Nagy, T.; Csiszovszki, Z.; Orosz, L. ; Papp, P.P. (2004). Integrative plsmid vector for constructing single-copy reporter systems to study gene regulation in *Rhizobium meliloti* and related species. *Plasmid*, **52,** 57-62.

Ferguson, G.C.; Heinemann, J.A.; Kennedy, M.A. (2002). Gene transfer between *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* insid epithelial cells. *J. Bacteriol.*, **182,** 2235-2242 .

Fullner, K.J.; Cano, L.J.; Nester, E.W. (1996). Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer gene . *Science* , **273,** 1107-1109 .

Garcia-de los, S. A.; Brom, S.; Romero, D. (1996). *Rhizobium* plasmids in bacteria legume interactions. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 119-125.

Hellens, R.; Mullineaux, P.; Klee, H. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trend. in Plant Sci.*, **5,** 446-451.

Hill, S.A. (1999). Cell to cell transmission of donor DNA overcomes differential incorporation of non-homologous and homologous markers in *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene*, **240,** 175-182 .

Hooykaas, P.J.J.; Schilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.*, **19,** 15-38 .

Kunik, T.; Tzfira. T.; Kapulnik, Y.; Gafni, Y.; Dingwall, C.; Citofsky, V. (2001). Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium* . *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **98,** 1871-1876.

Lichtenstein, C.; Draper, J. (1986). "In *DNA Cloning: A Practical Approach*", ed. Glover, D. M. (IRL, Oxford), Vol. 2

Lujan, S. A.; Guagas, M.; Ragonese, H.; Matson, S. W.; Redinbo, M. R. (2007). Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxae . *PNAS.*, **104,** 12282- 12287.

Mercado-Blanco, J.; Garcia, F.; Fernandez-Lopez, M.; Olivares, J.(1993). Melanin producion by *Rhizobium meliloti* GR4 to ponsymbiotic plamid pRmeGR4b: Cloning, Sequencing, and expression of the tyrosinase Gene *mepA*. *J. Bacteriol.*, **175,** 5403-5410.

Nerey, M.M.C.; Pichuantas, S.E.; Saavadra, C.P.; Araya, M. A.; Tantalean, J.C.; Vasquez, C.C. (2002). Expression of *Bacillus stearothermophilus* LV cadmium resistance genes in *E. Coli* causes hypersensitivity to cadmium chloride. *Curr. Miccrobiol.*, **45,** 187-190.

Olsen, J. E.; Brown, D.J.; Baggesen, D.L.; Bisgaard , M.(1992). Biochemical and molecular characterization of *Salmonella entrica* serovar *berta* , and comprision of method for typing. *Epidemiol. Infect.*, **108,** 243-260.

Park , D. (1996).Conservation of PcaQ, a transcriptional activator of *pca* genes for catabolism of phenolic compounds, in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium* species. *J. Bacteriol.*, **178,** 3671-3675.

Schultze, M.; Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development . *Annu. Rev. Genet.*, **32,** 33-57.

Streit, W.R.; Schmitz, R.A.; Perret, X.; Staehelin, C.; Deakin, W.J.; Raasch, C.; Liesegang, H.; Bronghton, W.J. (2004). An evolutionary hot spot: The PNGR234b replicon of *Rhizobium* spp. strain NGR234. *J. Bacteriol.*, **186,** 535-542.

Strohmaier, H.; Noiges, R.; Kotschan, S.; Sawers, G.; Hogenauer, G.; Zechner, E. L.;Koraimann, G. (1998). Single transduction and bacterial conjugation: Characterization of the role of Arc A in regulating conjugative transfer of the resistance plasmid R1. *J. Mol. Biol.*, **277,** 309-316.

Tejerizo, G.T.; Del Papa, M.F.; Giusti, M.D.; Draghi, W.; Lorenzo, M.; Lagares, A.; Pistorio, M. (2010). Characterization of extrachromosomal replicons present in the extended host range *Rhizobium* sp. LPU83 . *Plasmid.* **64,** 177-185.

Tzfira, T.; Citovky, V.(2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plant**s:** biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **17,** 147-154.

Vincente, A.; Aviles, M.; Codina, J.C.; Borrego, J.J.; Romero, P. (1989). Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aerogenosa* isolated from natural waters, *J. Appl. Bacteriol.*, **68 ,** 625-632.

Vincent, J.M. (1970). "A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria" . IBP handbook No.15 , Black Well Scientific Publication Oxford . UK.